

Aus dem Bakteriologisch-serologischen Untersuchungsamt  
Altona (Vorstand: Oberarzt Dr. Zeißler).

**Ueber die praktische Verwendbarkeit des Metachromgelbs und metachromgelb-ähnlicher Stoffe für differentialdiagnostische und andere Nährböden.**

Von Professor Dr. G. Gaßner (Braunschweig).

In mehreren Mitteilungen <sup>1)</sup> habe ich auf die besonderen Vorzüge hingewiesen, welche ein entsprechend gewählter Metachromgelbzusatz bei der Herstellung von Nährböden bietet, die zum Auffinden von Typhus-, Paratyphus- und Ruhrkeimen aus Bakteriengemischen, vor allem Stuhlproben, bestimmt sind. Der Vorteil, den das Metachromgelb bietet, besteht in der vollständigen Hemmung aller störenden Kokken und Sporenbildner, wobei es sich, wie in einer demnächst im Zbl. f. Bakt. erscheinenden Arbeit gezeigt werden wird, um eine durch das Metachromgelb bedingte spezifische Unterdrückung der Gram-positiven Keime handelt, während dieser Farbstoff, auch in gesättigter Lösung, das Wachstum der Gram-negativen Keime, darunter also auch das der Angehörigen der Typhus-Ruhrgruppe, nicht im entferntesten stört. Kombiniert man das Metachromgelb mit einem geeigneten blauen Farbstoff, als welchen ich Wasserblau 6 B extra P empfohlen habe, so resultiert ein grüner Nährboden, auf dem Typhus, Paratyphus und Ruhr unter Aufhellung ins Gelbliche, die Säurebildner Koli aber und andere unter Blauschwarzfärbung wachsen. Infolge dieses doppelten Farbenumschlags von Grün zu Gelblich bzw. Tiefblau habe ich dem Nährboden seinerzeit den Namen Dreifarben Nährboden gegeben; über die in der seither verflossenen Zeit mit diesem Nährboden gemachten günstigen Erfahrungen ist unlängst in Gemeinschaft mit Zeißler berichtet, in Gemeinschaft mit dem gleichen Autor auch ein Verfahren zur Regeneration des Agars aus solchem Dreifarben Nährboden ausgearbeitet <sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> M. m. W. 1917 S. 505; Zbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 80 S. 120 u. 219. — <sup>2)</sup> Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. 80 S. 253.

Das in den Versuchen verwendete und zur Nährbodenbereitung empfohlene Metachromgelb ist das Metachromgelb II RD der Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation; in Nr. 15 der M. m. W. des Jahrgangs 1917 habe ich von Metachromgelb II RP gesprochen, weil die noch in Originalpackung befindlichen Flaschen mit diesem Farbstoffe die letztere Bezeichnung trugen. Nach brieflicher Mitteilung der Firma war die Bezeichnung II RP irrtümlich, es muß II RD heißen.

Neuerdings hatte ich nun Gelegenheit, einige dem Metachromgelb II RD chemisch nahestehende Stoffe, das Metachromgelb RA und das Metachromorange R, auf ihre Brauchbarkeit für Typhusnährböden an Stelle des bisher vorgeschlagenen Metachromgelb II RD zu prüfen, mit dem Ergebnis, daß beide Stoffe in gleicher Weise und in annähernd gleicher Intensität ebenfalls die Gram-positiven Keime total unterdrücken, ohne Wachstum und Agglutinationsvermögen der herauszuzüchtenden Typhus-Ruhrkeime irgendwie zu schädigen. Für die praktische Herstellung eines brauchbaren Dreifarben-nährbodens kommt jedoch nur das Metachromgelb RA in Frage, weil der Metachromorangeagar aus unbekannten Gründen (Reduktionswirkung?) in wenigen Tagen abbläßt, sodaß der mit diesem Farbstoff und Wasserblau hergestellte, ursprünglich schön grüne Nährboden in wenigen Tagen eine rein blaue Farbe annimmt; Typhus und Ruhr wachsen dann einfach aufhellend, Koli und andere Säurebildner unter tiefer Schwärzbläuung. Betont sei, daß die hemmende Wirkung des Metachromorange auf Gram-positive Keime trotz seiner Entfärbung bestehen bleibt, sodaß von diesem Gesichtspunkte aus einer Verwendung des Farbstoffs nichts im Wege steht; anderseits muß es doch als Nachteil empfunden werden, daß der mit Metachromorange hergestellte Nährboden in der Färbung inkonstant ist.

Für Nährböden zu Typhus-Ruhruntersuchungen empfehle ich daher außer dem früher bereits vorgeschlagenen Metachromgelb II RD nur das Metachromgelb RA; die Anwendung des letzteren bleibt die gleiche wie die des Metachromgelb II RD; nach der früher gegebenen Vorschrift füge man also zu 2 Liter schwach lackmusalkalischen Nährbodens 125 ccm 2%ige Lösung Metachromgelb II RD oder RA (2 Minuten aufgekocht) und 175 ccm 1%ige Lösung Wasserblau + 100 g Milhzucker (10 Minuten aufgekocht); bei sehr dünn gegossenen Platten empfiehlt es sich übrigens, im Farbstoffzusatz auf 150 ccm Metachromgelblösung und 200 ccm Wasserblaulösung hinaufzulegen.

Das Metachromgelb RA entsteht, nach freundlicher Mitteilung der Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation, durch Kombination von diazotiertem Metanitroanilin mit Salizylsäure, das Metachromorange R durch Kombination von Paranitroanilin mit Salizylsäure. Die Farbstoffe sind also als Meta- bzw. Paranitro-Benzol-Azö-Salizylsäure zu bezeichnen.

Durch das besondere Entgegenkommen der Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation konnte ich noch drei weitere, für meine Versuchszwecke besonders angefertigte Azofarben, Nr. 501; 502 und 503, auf ihre Brauchbarkeit zur elektiven Herauszüchtung Gram-negativer Keime untersuchen. Farbstoff 501 stellt Paraanisidin mit Salizylsäure gekuppelt dar, Nr. 502 Paranitroanilin mit 1 : 4 Naphtholsulfosäure gekuppelt, Nr. 503 Paranitroanilin mit 1 : 4 Naphthylamin-sulfosäure gekuppelt. Ueber die Kulturversuche auf Nährböden mit diesen Farbstoffen wird demnächst im Zbl. f. Bakt. ausführlich berichtet werden, hier genüge die Feststellung, daß von den untersuchten Stoffen nur der Farbstoff Nr. 501 eine elektive Wirkung zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Keimen erkennen läßt und in ähnlicher Weise wirkt wie die oben erwähnten Metachromgelbstoffe; die Wirkung ist jedoch intensiver, sodaß bereits eine Konzentration von 0,025% genügt, um bei der üblichen schwach lackmusalkalischen Reaktion des Nährbodens alle Gram-positiven Keime zu unterdrücken; für die Kombination eines Farbstoff 501-Wasserblau-Dreifarben-nährbodens würde also an Stelle eines Zusatzes von 125 bis 150 ccm Metachromgelb ein entsprechender Zusatz von nur 40 ccm einer 2%igen Lösung des Farbstoffs 501 genügen; der Wasserblaugehalt bleibt derselbe.

So haben wir also mehrere Stoffe, die sich für die Zusammensetzung eines Dreifarben-nährbodens für Typhus-Ruhruntersuchungen in gleicher Weise eignen, und es dürfte kein Zweifel sein, daß sich noch weitere, in ähnlicher Weise brauchbare Stoffe ausfindig machen lassen werden. Bei der überaus prägnanten Wirkung der metachromgelbartigen Stoffe auf Gram-positive Keime erscheint es nun aber auch an der Zeit, derartige Stoffe auch mit anderen Nährböden zu kombinieren, bei denen eine Hemmung Gram-positiver Keime wünschenswert ist.

Das gilt zunächst für Choleranährböden, auf denen ja infolge ihrer stark alkalischen Reaktion das Wachstum vieler Keime von vornherein ausgeschlossen ist, bestimmte Gram-positive Keime jedoch noch recht häufig störend zur Entwicklung kommen können. Da die Gram-negativen Choleraeide durch Metachromgelbzusatz in keiner Weise leiden, so gibt dieser auch hier ein sehr einfaches Mittel

in die Hand, störende Gram-positive Keime völlig auszuschließen. Im Hinblick darauf, daß Choleraelektivnährböden eine relativ starke alkalische Reaktion aufweisen, die Wirkung des Metachromgelbs aber mit steigender Alkaleszenz abnimmt, muß der Metachromgelbzusatz entsprechend höher gewählt werden als bei dem obigen Dreifarben-nährboden; für den neuerdings vorgeschlagenen und bewährten alkalischen Stärkeagar erscheint ein Zusatz von 100 ccm 2%iger Metachromgelblösung auf einen Liter Nährboden angebracht und ausreichend. Für Choleranährböden vom Typ des Dieudonné'schen Blutalkalagars, in denen ein wesentlicher Serumzusatz vorhanden ist, erscheint im Hinblick auf weiter unten zu besprechende Beobachtungen über verminderte Metachromgelbwirkung bei Zusatz von Serum zum Nährboden die Frage der Wirksamkeit des Metachromgelbzusatzes noch einer besonderen Nachprüfung bedürftig. Dagegen kann in flüssigen, zur Anreicherung bestimmten Nährlösungen einem Ueberwuchern der Choleraeide durch Gram-positive Keime durch einen Zusatz von 0,1 bis 0,15% Metachromgelb mit Sicherheit vorgebeugt werden.

Von ganz besonderem Werte wäre nun weiter die Zusammenstellung eines für Gram-negative Kokken (Meningokokken, Gonokokken) elektiv wirksamen Nährbodens. Die bisherigen diesbezüglichen Versuche, in denen Aszitesagarplatten + 0,15% Metachromgelb und Menschenblutagarplatten + 0,15% Metachromgelb zur Anwendung kamen, führten jedoch nicht zu einem befriedigenden Ergebnis, weil sich zeigte, daß der 0,15%ige Metachromgelbzusatz, der auf gewöhnlichem Nähragar schwach lackmusalkalische Reaktion aller Gram-positiven Keime unterdrückt, dies trotz gleichbleibender Reaktion des Nährbodens bei Zusatz von Aszites oder Menschenblut nicht mehr tut. In noch stärkerem Maße als bei dem eben erwähnten Aszites- bzw. Blutzusatz sank die hemmende Wirkung des Metachromgelbs auf Gram-positive Keime bei einer Kombination von Metachromgelb und Löffler'serum, wo auch die vielfach stärkere Dosis (0,5% Metachromgelb) kein Zurückdrängen Gram-positiver Keime mehr erkennen ließ. Die Frage, welche Metachromgelbkonzentration auf serumhaltigen Nährböden geeignet ist, eine Unterdrückung der Gram-positiven Keime zu gewährleisten, muß daher vorläufig offenbleiben; auch fehlt bisher der Nachweis, daß durch die voraussichtlich anzuwendenden hohen Metachromgelbkonzentrationen eine gleichzeitige Schädigung der herauszuzüchtenden Gram-negativen Kokken vermieden wird, weshalb sich Vorschläge im Sinne eines für Gram-negative Kokken elektiv wirksamen Metachromgelbnährbodens zurzeit nicht machen lassen.

Für eine bestimmte weitere Nährbodengruppe kann ich dagegen noch auf Grund eigener günstiger Erfahrungen einen Metachromgelbzusatz dringend empfehlen; es sind das die Nährböden zur Impfstoffgewinnung. Hier spielen ja Verunreinigungen durch Gram-positive Sporenbildner, die sich nur sehr schwer abtöten lassen, zuweilen eine unangenehme Rolle; ein im Bereiche des hiesigen Untersuchungsamts beobachteter Fall einer solchen Verunreinigung, bei dem ein aus Berlin gelieferter Typhusimpfstoff zu Erkrankungen nach der Impfung geführt hatte, weil er (auch in den ungeöffneten Flaschen der gleichen Herstellungsbezeichnung) reichlich einen Gram-positiven Sporenbildner enthielt, gab die unmittelbare Veranlassung ab, der Frage einer Verbesserung der Nährböden zur Impfstoffgewinnung durch Ausschluß Gram-positiver Keime mittels Metachromgelbzusatzes experimentell näherzutreten. Daher wurden für den Bedarf des hiesigen Krankenhauses angefertigte Impfstoffe von Gram-negativen Keimen mehrfach auf Metachromgelbagar gewonnen und jegliches Wachstum Gram-positiver Keime so von vornherein unterbunden. Von dem dem Nährboden beigegebenen Metachromgelb diffundiert natürlich ein bestimmter Prozentsatz in die zur Herstellung der Abschwemmung benutzte Kochsalzlösung hinein und verfärbt diese gelblich. Uebelstände bei der Impfung haben sich jedoch durch diese geringe Metachromgelbbeimengung nicht herausgestellt. Bei einem Metachromgelbzusatz von 0,15% zum Nährboden beträgt die in einer Kulturschale von etwa 20 cm Durchmesser enthaltene Metachromgelbmenge höchstens 0,1 g; nehmen wir an, was natürlich längst nicht der Fall ist, daß die Hälfte davon in die NaCl-Lösung hineindiffundiert, so hätten wir eine Menge von 0,05 g in der von einer Kulturschale gewonnenen Abschwemmung. Bedenken wir weiter, daß die Abschwemmung dann noch entsprechend verdünnt wird und daß zur Impfung höchstens wenige Kubikzentimeter verwendet werden, so kommen wir auf äußerst geringe Beträge, bei denen eine Schädigung von vornherein ausgeschlossen erscheint. Vorsichtigerweise bat ich Herrn Geh.-Rat Prof. Dr. Kobert (Rostock) noch um eine experimentelle Prüfung der Giftigkeit des Metachromgelbs im Tierversuche. Herr Geh.-Rat Kobert war so freundlich, die erbetene Prüfung auszuführen, To für ich ihm auch an dieser Stelle verbindlichst danken möchte, und schreibt mir über das Ergebnis Folgendes: „Die meisten solcher Farbstoffe zerstören das Hämoglobin. Die 0,3%ige Lösung des Metachromgelbs dagegen bleibt selbst bei 48stündiger Einwirkung auf

Hämoglobinlösungen aus Hammelblutkörperchen indifferent; das Spektrum des Oxyhämoglobins bzw. des reduzierten Hämoglobins bleibt unverändert. Frösche von 25 g Körpergewicht, und zwar sowohl Eskuienten als Temporarien, ertragen Dosen von 20 mg ohne Schaden, was pro kg Körpergewicht ja 0,8 g ausmacht. Das Gleiche gilt für Kröten (*Bufo cinereus*). Ein Meerschweinchen von 250 g ertrug subkutan 0,1 g, also pro kg Körpergewicht 0,4 g, ohne Schaden. Der Harn blieb eiweißfrei und ungefärbt. Eine Katze von 2500 g erhielt erst 0,2 g, dann 0,4 g des Mittels unter die Haut, ohne aufzuhören zu fressen. Bei 0,4 g (d. h. bei 0,16 g pro kg) bekam sie leichte Gelbfärbung des Harnes, und dieser enthielt Spuren von Eiweiß. Sie können also sehr wohl behaupten, daß dieses Mittel in den für Sie in Betracht kommenden Dosen als ungiftig zu bezeichnen ist.“

Unter diesen Umständen dürfen wir einen Zusatz von Metachromgelb zu Nährböden für Impfstoffgewinnung pathogener Gram-negativer Keime (Typhus, Ruhr, Cholera u. a.) als unbedenklich und gestattet ansprechen. Ein Zusatz von 0,15% (75 ccm einer 2%igen Metachromgelblösung auf 1 Liter Nährboden) ist bei der üblichen schwach lackmusalkalischen Reaktion des Nährbodens ausreichend, um die Unterdrückung aller Gram-positiven Keime, vor allem der bei der Impfstoffbereitung besonders lästigen Sporenbildner, mit Sicherheit zu gewährleisten, und erleichtert so außerordentlich die Herstellung eines einwandfreien Impfstoffs.